РЕЗЮМЕ

Разработана иммуноферментная тест-система для количественного определения антител к вирусу гриппа птиц подтипа H5 при тестировании проб в одном разведении. Титр антител определяли по проценту ингибиции, измеренному в рабочем разведении исследуемых проб. Определили позитивно-негативный порог для более объективной оценки иммунного ответа. Специфичность и чувствительность метода сравнивали с реакцией торможения гемагглютинации. Разработанную тест-систему применяли при проведении мониторинговых исследований для выявления антител к вирусу гриппа птиц подтипа H5 у диких птиц и изучении поствакцинального иммунитета у домашних птиц.

SUMMARY

An ELISA test-system was developed to quantify antibodies to avian influenza virus subtype H5 in samples tested in a single dilution. The antibody titre was determined according to the inhibition rate measured in a working dilution of tested samples. A positive-negative threshold for a more objective evaluation of the immune response was established. The specificity and sensitivity of the given method were compared with those of the hemagglutination inhibition test. The developed test-system was used for monitoring antibodies to avian influenza virus subtype H5 in wild birds and for studying the post-vaccination immunity in poultry.

Литература

1. Болезни домашних и сельскохозяйственных птиц / под ред. Б.У. Келнека. М.: АКВАРИУМ БУК-, 2003. 1232 с.
2. Международная агропромышленная выставка «АГРОРУСЬ 2005». Круглый стол «Актуальные проблемы промышленного птицеводства – грипп птиц» / ЛЕНЭКСПО Вып 1. СПб, 2005, 14 с.
3. Троценко Н.И. Практикум по ветеринарной вирусологии / Троценко Н.И., Белоусова Р.В., Преображенская Э.А. // 2-е изд., перераб. и доп. М.: Колос, 1999.
4. Циванюк М.А. Получение культурального вируса гриппа птиц подтипа H5N1 и его использование в качестве антигена для серологических реакций / М.А. Циванюк, Н.Н. Луговская, Н.С. Мудрак [и др.] // Тр. Федерального центра охраны здоровья животных Владимир, 2007. С. 144-155.
5. Чвала И.А. Разработка диагностического набора для определения уровня антител к вирусу гриппа птиц в РТГА/ И.А.Чвала, М.А.Циванюк, Н.Н. Луговская [и др.] //3-й Международный ветеринарный конгресс по птицеводству. М.: 2007. С. 73–78.
6. Ямникова С.С. Стратегия и тактика борьбы с гриппом на различных этапах эпидемиологического процесса /С.С. Ямникова, О.Н. Виткова, М.В Калмыков [и др.] //Ветеринарная медицина 87: міжвідомчий тематичн. наук. збірник. Харків, 2006. С. 307-312.

УДК 619:616.98:587.832.1:598.2:573.6.086.83:57.083.3

М.А. Циванюк, Н.Н. Луговская, Н.С. Мудрак, В.В. Дрыгин, Е.В. Белик

НЕПРЯМОЙ ВАРИАНТ ИФА ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ И КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ АНТИТЕЛ К ВИРУСУ ГРИППА ПТИЦ ПРИ ТЕСТИРОВАНИИ ПРОБ В ОДНОМ РАЗВЕДЕНИИ

Введение

Грипп птиц (ГП) – инфекционная болезнь домашних, синантропных и диких птиц, которая проявляется в виде эпизоотий и может протекать как в тяжелой форме, так и бессимптомно. Возбудителем заболевания является РНК-содержащий вирус с сегментированным геномом семейства Orthomyxoviridae, рода *Influenzavirus*, типа А [5, 7, 11].

В настоящее время практически все страны столкнулись с проблемой распространения гриппа птиц, обусловливающей не только экономические потери, связанные с гибелью птицы, вынужденным убоем, затратами на проведение ветеринарно-санитарных мероприятий, но и угрозу возникновения пандемии, которая может характеризоваться высокой смертностью, социальными проблемами и громадным экономическим ущербом [2, 8, 12, 13].

Ретроспективная диагностика является основополагающим фактором для своевременной защиты поголовья от инфекционных заболеваний. Важную роль играют серологические методы, такие, как реакция диффузионной преципитации (РДП), реакция торможения гемагглютинации (РТГА), реакция нейтрализации (РН) и иммуноферментный анализ (ИФА), позволяющие не только обнаружить специфические антитела на ранних стадиях болезни, но и оценить иммунитет, полученный в результате вакцинации [10].

Непрямой вариант ИФА – высокочувствительный и специфичный метод, удобен для анализа больших количеств образцов малого объема в лабораториях с самым

простым оснащением. Эти преимущества особенно важны при эпидемиологических обследованиях и массовой диагностике инфекционных заболеваний [3, 4, 15].

Многие зарубежные фирмы: «Anigen» (Корея), «Synbiotics» (США), выпускают коммерческие иммуноферментные наборы для выявления антител к вирусу гриппа типа А, но их применение не всегда экономически оправдано, особенно при мониторинговых исследованиях, в связи с высокой стоимостью [1, 6].

Поэтому актуальным является создание отечественных тест-систем на основе непрямого варианта ИФА для проведения мониторинговых исследований, а также для выявления и количественной оценки уровня антител к вирусу гриппа птиц, результаты которых будут коррелировать с результатами базовых реакций и рекомендованных Международным эпизоотическим бюро коммерческих наборов для диагностики гриппа птиц.

Таким образом, целью нашей работы была разработка отечественной тест-системы на основе непрямого варианта ИФА для выявления антител к вирусу гриппа птиц при исследовании проб сывороток крови кур в одном разведении в соответствии с требованиями Международного эпизоотического бюро (МЭБ) и сравнение полученной тест-системы с коммерческими наборами для обнаружения антител против вируса гриппа в ИФА («Synbiotics», Франция), в РТГА и РДП (ФГУ «ВНИИЗЖ»).

Материалы и методы

Антиген вируса гриппа птиц подтипа H5N1**.** Используемый антиген вируса гриппа птиц подтипа H5N1, полученный в перевиваемой культуре клеток MDCK, концентрировали согласно ранее описанной методике [9].

Контрольные пробы. В качестве положительного контроля использовали сыворотку крови кур, полученную против вируса ГП (ФГУ «ВНИИЗЖ»); в качестве отрицательного – сыворотку крови кур, не содержащую антител к вирусу ГП (ФГУ «ВНИИЗЖ»).

Конъюгат антивидовых антител. Использовали коммерческий препарат антикуриных козьих антител, конъюгированных с пероксидазой хрена (ГУНИИЭМ им. Н.Ф. Гамалеи, Москва).

Постановка непрямого твердофазного варианта ИФА для выявления антител к вирусу гриппа птиц в сыворотках крови кур. Реакцию проводили по стандартной методике с небольшими модификациями [9].

Коммерческие набор*:*

- Набор для выявления антител к вирусу гриппа птиц в непрямом варианте ИФА «Avian Influenza Virus Antibody Test Kit», «Synbiotics» (США);
- «Набор для выявления антител к вирусу гриппа птиц в реакции диффузионной преципитации» (ФГУ «ВНИИЗЖ»);
- «Набор для выявления антител к вирусу гриппа птиц подтипа H5 в реакции торможения гемагглютинации» (ФГУ «ВНИИЗЖ»).

Все наборы использовали согласно наставлениям по применению.

Результаты и обсуждение

Разработка тест-системы включала в себя определение рабочего разведения сывороток, выведение уравнения линейной регрессии для рассчета титра, определение оптимального диапазона оптической плотности контролей, установление позитивно-негативного порога и на его основе наименьшего положительного титра для количественного учета результатов.

Определение оптимального разведения сыворотки. Для выбора оптимального рабочего разведения исследовали сыворотки с разным уровнем антител к различным подтипам вируса гриппа типа А в разведениях 1:100, 1:200, 1:400 и вычисляли значение S/P (отношение оптической плотности испытуемой сыворотки за вычетом оптической плотности отрицательного контроля к разнице между оптическими плотностями положительного и отрицательного контролей).

Результаты обрабатывали с применением компьютерной программы Statistica (Correlation matrices). Для каждого разведения определяли коэффициент корреляции со значением титров, определенных методом последовательных разведений, которые составили 0,92 для разведения 1:100; 0,94 для разведения 1:200 и 0,97 для разведения 1:400. Разведение 1:400 имело наибольший коэффициент корреляции и было выбрано рабочим.

Уравнение линейной регрессии. В соответствии со значениями оптических плотностей исследуемых сывороток с помощью программы Statistica была построена калибровочная прямая и выведено уравнение линейной регрессии для количественного определения титров к вирусу гриппа типа А (рис. 1).

Позитивно-негативный порог. Для объективной оценки иммунного ответа устано-

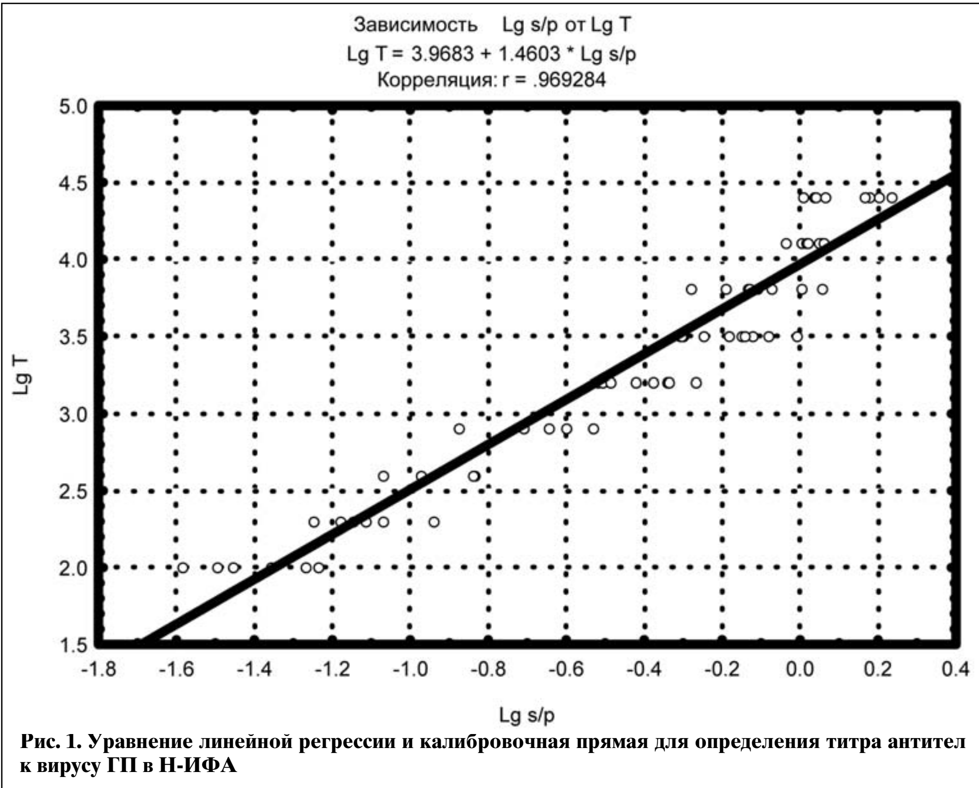


Рис. 1. Уравнение линейной регрессии и калибровочная прямая для определения титра антител к вирусу ГП в Н-ИФА

Таблица 1

Статистические параметры для расчета ПНП

Разведение	Кол-во проб	Среднее значение ОП	Мин. значение ОП	Макс. значение ОП	Стандартное отклонение
1:400	63	0,102	0,071	0,221	0,029

Таблица 2

Определение диапазона допустимых значений отрицательной контрольной сыворотки

Среднее значение ОП	Станд. отклонение	Доверительный интервал
0,102	0,029	0,044-0,160

Таблица 3

Определение диапазона допустимых значений положительной контрольной сыворотки

Кол-во проб	ОП сред. сыв-к в разведении 1:400	Титр в Н-ИФА	ОП положит. сыв-ки (lgT=2,903)	ОП положит. сыв-ки (lgT=3,505)
21	0,269	1:1600	0,998	0,449

вили позитивно-негативный порог (ПНП). Шестьдесят три заведомо отрицательные сыворотки крови кур, предварительно протестированные с использованием коммерческого набора «Avian Influenza Virus Antibody Test Kit», «Synbiotics» (Франция), исследовали в Н-ИФА в разведении 1:400. В качестве положительного и отрицательного контроля были взяты стандартные контрольные сыворотки. ПНП вычисляли путем прибавления трех значений стандартного отклонения к оптической плотности отрицательных сывороток. Полученный ПНП представляет собой границу, отражающую верхние 0,5% отрицательных величин. В табл. 1 представлены результаты расчетов по методу, описанному выше.

Среднее значение оптической плотности отрицательных сывороток, суммированное с утроенным значением стандартного отклонения, составило 0,189.

С учетом возможных погрешностей, допустимых в пределах одного разведения, где Т/2 < Т > ТЧ2, выделялась зона сомнительных результатов. Таким образом, титр антител в пределах 0-640 считался отрицательным, 641-1280 – сомнительным, от 1281 и выше – положительным.

Таблица 4

Матрица для диагностических исследований

Исследуемые пробы	Заведомо положительные пробы	Заведомо отрицательные пробы
положительные	a	b
отрицательные	c	d

Относительная чувствительность = a / (a + c) Ч 100%;
Относительная специфичность = d / (b + d) Ч 100%;
Точность = (a +d) / (a + b + c + d) Ч 100%

Таблица 5

Сравнение результатов исследования сывороток крови кур в Н-ИФА с использованием коммерческого набора фирмы «Synbiotics» и тест-системы «ВНИИЗЖ»

Н-ИФА «ВНИИЗЖ»	Н-ИФА «Synbiotics»	
	положительные	отрицательные
положительные	36	6
отрицательные	0	17

Таблица 6

Сравнение чувствительности Н-ИФА и РТГА

Н-ИФА	РТГА	
	положительные	отрицательные
положительные	79	0
отрицательные	6	6

Выбор допустимых значений контрольных сывороток. Для получения достоверных результатов при подсчете титра антител в исследуемых сыворотках необходимо учитывать, входят ли значения оптических плотностей положительного и отрицательного контролей в диапазон допустимых значений. Этот диапазон для отрицательной контрольной сыворотки определяли как среднее значение ОП сывороток, не имеющих антител к вирусу ГП, с учетом доверительного интервала (табл. 2).

Для определения диапазона допустимых значений положительного контроля брали 21 сыворотку с титром, равным 1:1600, и исследовали в Н-ИФА в разведении 1:400. Среднее значение ОП подставляли в уравнение линейной регрессии со значением lgT=2,903 и lgT=3,505, что соответствует титрам 1:800 и 1:3200, для вычисления ОП положительного контроля (табл. 3).

Допустимыми значениями оптической плотности контрольных сывороток к вирусу ГП являлись значения, лежащие в пределах: для положительного контроля – от 0,450 до 1,000, для отрицательного контроля – от 0,045 до 0,160.

Сравнение чувствительности и специфичности разработанной тест-системы для выявления антител к вирусу гриппа типа А с коммерческим набором. Сыворотки, использованные в исследовании, были протестированы с применением набора для выявления антител к вирусу гриппа птиц в непрямом варианте ИФА «Avian Influenza Virus Antibody Test Kit», «Synbiotics» (Франция), что позволило оценить относительную чувствительность и специфичность тест-системы. Было параллельно протестировано 59 сывороток с различным уровнем антител к вирусу гриппа типа А (табл. 5).

Чувствительность и специфичность разработанной тест-системы подсчитывали по следующим формулам:

Относительная чувствительность тест-системы на основе Н-ИФА с использованием антигена вируса ГП подтипа H5N1 составила 100%, относительная специфичность – 74%. Точность результатов, полученных в Н-ИФА с использованием антигена вируса ГП подтипа H5N1, и коммерческого набора для выявления антител к вирусу гриппа птиц в непрямом варианте ИФА «Avian Influenza Virus Antibody Test Kit», «Synbiotics» (Франция), составляла 90%.

Сравнение чувствительности и специфичности разработанной тест-системы для выявления антител к вирусу гриппа типа А с РТГА и РДП. Для сравнения чувствительности непрямого варианта ИФА и РДП исследовали сыворотки, полученные после иммунизации разными сериями «Инактивированной эмульгированной вакцины против вируса гриппа птиц подтипа Н5» производства ОАО «Покровского завода биопрепаратов» и предварительно протестированные в РТГА на наличие антител к гемагглютинину Н5. Исследование в РТГА показало, что 85 проб из 91 были положительные (табл. 6).

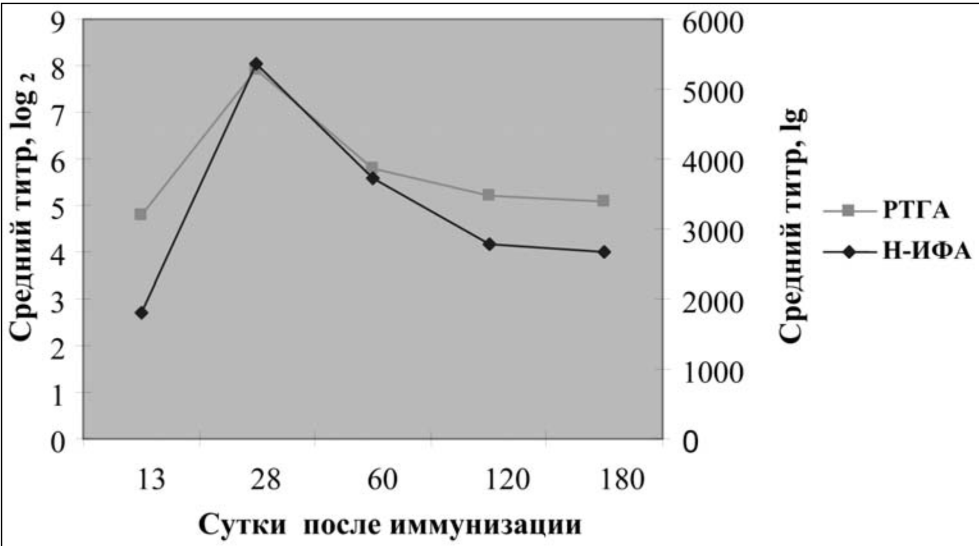


Рис. 2. Динамика поствакцинальных титров антител к вирусу гриппа типа А подтипа H5N1 у цыплят при исследовании в Н-ИФА и РТГА

Таблица 7

Сравнение чувствительности Н-ИФА и РДП

РДП	Н-ИФА	
	положительные	отрицательные
положительные	72	0
отрицательные	7	12

Как видно из табл. 6, РТГА показал большую чувствительность по сравнению с Н-ИФА. Относительная чувствительность Н-ИФА относительно РТГА составила 93%, относительная специфичность – 100%. Точность результатов, полученных в Н-ИФА и РТГА, составляла 93%.

Как показано в табл. 7, Н-ИФА показал большую чувствительность, по сравнению с РДП. Относительная чувствительность РДП по отношению к Н-ИФА составила 91%, относительная специфичность – 100%. Точность результатов, полученных в Н-ИФА и РДП, составляла 92%.

Выявление антител к вирусу гриппа типа А в разные сроки после вакцинации. Тест-системы на основе непрямого варианта ИФА применяли для изучения динамики накопления антител в сыворотках крови, иммунизированных «Инактивированной эмульгированной вакциной против вируса гриппа птиц подтипа Н5» производства ОАО «Покровский завод биопрепаратов». Для вакцинации использовали 60-суточных цыплят, свободных от антител к вирусу гриппа птиц. Средние титры приведены по результатам исследования сывороток крови цыплят, иммунизированных 1-17 сериями «Инактивированной эмульгированной вакцины против вируса гриппа птиц подтипа Н5» производства ОАО «Покровский завод биопрепаратов».

Как представлено на рис. 2, уже на 13 день после вакцинации средний титр антител был положительным и составил 1:1818. К 28 дню после иммунизации – 1:5354. В течение последующих 5 месяцев наблюдали постепенное снижение уровня антител, и через 6 месяцев после иммунизации средний титр составил 1:2659.

В качестве подтверждающего теста использовали РТГА. При исследовании сывороток крови, полученных на 13 сутки после иммунизации в РТГА, средний титр антител к вирусу ГП подтипа Н5 составил 4,8 $\log_2$. Максимальный средний титр, равный 7,9 $\log_2$, также наблюдали через 28 суток после вакцинации. Через 6 месяцев средний титр составлял 5,1 $\log_2$.

Как показано на рис. 2, результаты, полученные в РТГА и Н-ИФА, в значительной степени коррелировали друг с другом.

Выводы

Тест-система на основе Н-ИФА с использованием культурального антигена вируса ГП подтипа H5N1 обладает высокой чувствительностью и специфичностью и может найти широкое применение в ветеринарной практике для серологической диагностики гриппа птиц.

РЕЗЮМЕ

Разработана иммуноферментная тест-система для количественного определения антител к вирусу гриппа птиц при тестировании сывороток крови кур в одном разведении. Титр антител определяли по S/P отношению, измеренному в рабочем разведении исследуемых проб. Определили позитивно-негативный порог и оптимальные значения оптической плотности контрольных сывороток. Специфичность и чувствительность метода сравнивали с коммерческими наборами для выявления антител к вирусу гриппа птиц в непрямом варианте ИФА («Synbiotics»), РТГА и РДП (ФГУ «ВНИИЗЖ»). Разработанную тест-систему применяли при изучении динамики формирования поствакцинального иммунитета.

SUMMARY

An ELISA test-system was developed to quantify antibodies to avian influenza virus in chicken sera samples tested in a single dilution. The antibody titre was determined according to S/P ratio measured in a working dilution of tested samples. A positive-negative threshold and optimal optical density values of control sera were specified. The specificity and sensitivity of the given method were compared with those of commercial kits for detection of antibodies to avian influenza virus by indirect ELISA («Synbiotics»), hemagglutination inhibition test and diffusion precipitation test (FGI «ARRIAH»). The developed test-system was used for studying the dynamics of postvaccinal immunity creation.

Литература

1. Верховский О.А. Иммуноферментные тест-системы для оценки иммунногенного статуса птиц/ О.А. Верховский., Т.А.Тимофеева, С.Л. Кальнов // БИО. 2004. №5. С.31-32.
2. Высокопатогенный грипп птиц и грипп человека/А.А.Воробьев, В.В. Макаров, Б.В. Боев, В.М. Бондаренко // Вет. патология 2004. №3. С. 45-51.
3. Теория и практика иммуноферментного анализа / А.М. Егоров [и др.] М.: Высш. шк., 1991. 345с.
4. Иммуноферментный анализ / под ред. Т.Т. Нго, Г. Ленхофф. М.: Мир, 1988. 336 с.
5. Лимаренко А.А. Болезни сельскохозяйственных птиц/ А.А. Лимаренко, И.С. Дубров, А.А. Таймасуков [и др.] СПб. Лань 2005. 448 с.
6. Сравнительная оценка коммерческих тест-систем для диагностики гриппа птиц / Н.Н. Луговская, М.А. Циванюк, Н.С. Мудрак [и др.] // Ветеринарная медицина 87. Міжвідомчий тематичний науковий збірник. Харків, 2006, С. 307- 312.
7. Макаров, В.В. Высокопатогенный грипп птиц / В.В. Макаров // Ветеринария в птицеводстве. 2004. №2. С. 4–9.
8. Международная агропромышленная выставка « АГРОРУСЬ 2005». Круглый стол «Актуальные проблемы промышленного птицеводства – гриппа птиц» // ЛЕНЭКСПО Вып.1. СПб. 2005. 14 с.
9. Получение культурального вируса гриппа птиц подтипа H5N1 и его использование в качестве антигена для серологических реакций / М.А. Циванюк, Н.Н. Луговская, Н.С. Мудрак [и др.] // Тр. Федерального центра охраны здоровья животных. Владимир, 2007. т. 5. С. 144-155.
10. Разработка диагностического набора для определения уровня антител к вирусу гриппа птиц в РТГА/ И.А.Чвала, М.А. Циванюк, Н.Н.Луговская [и др.] // 3-й Междунар. вет.конгр. по птицеводству. М, 2007. С. 73–78.
11. Alexander, D.J. Control strategies of the International Office of Epizooties, the European Union and the harmonization of international standards for the diagnosis of avian influenza // Proc. 4th Int. Symp. on Avian Influenza/ United States Animal Health Assoc., Richmond, Virginia, 1998. P. 353-357.
12. Brown, E.G. Influenza virus genetics/E.G. Brown// Biomed. Pharmacother. 2000 Vd.54. P. 196-209.
13. Continued circulation in China of highly pathogenic avian influenza viruses encoding the hemagglutinin gene associated with the 1997 H5N1 outbreak in poultry and humdns / A. N. Cauthen, D.E. Swayne, S. Schulti-Cherry [et al.] // J. Virol. 2000. V.74. P. 6592-6599.
14. Suares, D.L. Evolution of avian influenza viruse / D.L. Suares // J. Vet. Microbiology 2000. N 7. P. 295-301.

УДК 619:616.98:578.831.1:578.831.3:615.371

И.А. Борисова, С.К. Старов, А.Б. Сарбасов

ИЗУЧЕНИЕ ИММУНОБИОЛОГИЧЕСКИХ СВОЙСТВ ИНАКТИВИРОВАННОЙ ЭМУЛЬСИОННОЙ ВАКЦИНЫ ПРОТИВ НЬЮКАСЛСКОЙ БОЛЕЗНИ И МЕТАПНЕВМОВИРУСНОЙ ИНФЕКЦИИ ПТИЦ В ПРОИЗВОДСТВЕННЫХ УСЛОВИЯХ

Введение

В последние годы (2003-2007 гг.) в промышленном птицеводстве Российской Федерации регистрировали случаи заболевания птиц различного возраста метапневмовирусной инфекцией со значительным экономическим ущербом, который складывается из прямых потерь (гибель, снижение продуктивности) и затрат на проведение ветеринарно-санитарных мероприятий [2, 4, 5].

Для специфической профилактики метапневмовирусной инфекцией птиц разработаны и используются живые и инактиви-